
学位論文

Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 システムによる 口腔癌のリンパ節転移・遠隔転移機構の解析

尾上 富太郎

キーワード: CXCR4, SDF-1, EMT, autocrine loop, 遠隔転移

Analysis of the Mechanism of Lymph Node and Distant Metastasis Mediated-SDF-1/CXCR4 System in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

Tomitaro ONOUE

Abstract : We have previously demonstrated that the association between the expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma (SCC) cells and stromal cell-derived factor (SDF)-1 produced by the lymphatic stromal cells was critical for the lymph node metastasis of oral SCC. Although the process of metastases in cancer cells is generally associated with morphological change, so-called epithelial-mesenchymal transition (EMT), the role of EMT in the metastatic process induced by the SDF-1/CXCR4 system remains unknown. On the other hand, it has been considered that the SDF-1/CXCR4 system mainly regulates distant metastases in cancer excluding oral SCC, by which cancer cells utilize SDF-1 produced by specific organs. In cases of oral SCC, the expression of CXCR4 is frequently detected; however, distant metastasis is clinically very rare, and the relation between the expression of CXCR4 and distant metastasis remains unclear. Thus, in the present study, I investigated the role of SDF-1/CXCR4 systems in the association of EMT in the metastatic process and in the relation of distant metastasis. Oral SCC cells, B88 and HNt, which have functional CXCR4 and lymph node metastatic potentials, were found to lose their epithelial cell morphology due to SDF-1 in the serum-starved condition. In this context, the downregulation of epithelial markers, cytokeratin, E-cadherin and β -catenin, and the upregulation of mesenchymal markers, vimentin and snail, were detected. Furthermore, upregulation of vimentin and the morphological change in 3-dimensional cultures by treatment with SDF-1 were impaired with phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor, wortmannin. These results suggested that EMT induced by the SDF-1/CXCR4 system might be involved in the lymph node metastasis of oral SCCs via activation of the PI3K-Akt/PKB pathway. Immunohistochemical staining of SDF-1 and CXCR4 using primary oral SCCs and metastatic lymph nodes showed a significantly higher number of SDF-1-positive cases among cancer cells in lymph nodes than among those in primary oral SCCs. Among all 6 patients with lung metastases, co-expression of SDF-1 and CXCR4 was detected. Thus, under the hypothesis that acquisition of the SDF-1/CXCR4 autocrine loop might be involved in the distant metastatic potential, I established B88-SDF-1 cells, by which SDF-1 was forcibly expressed. B88-SDF-1 cells acquired enhanced cell motility and anchorage-independent growth potential. Inoculation of B88-SDF-1 cells into nude mice resulted in the enhancement of

metastatic potential to the lymph nodes and in the acquisition of metastatic potential to distant organs. When genes regulated by the SDF-1/CXCR4 autocrine loop were investigated with cDNA microarray analysis, many functionally unknown genes were identified. Three genes upregulated in B88-SDF-1 cells with cDNA microarray analysis were found to be upregulated by RT-PCR, whose expressions were inhibited by a CXCR4 antagonist, AMD3100. AMD3100 significantly inhibited the lung metastasis of the SDF-1 transfectant, ameliorated body weight loss, and improved the survival rate of tumor-bearing nude mice. These results suggested that, in cases of oral SCCs, the SDF-1/CXCR4 paracrine loop potentiates lymph node metastasis associated with EMT, but distant metastasis might require the SDF-1/CXCR4 autocrine loop.

緒 言

口腔癌の発生率は全癌の約2.65%を占めるとされているが¹⁾, そのほとんどの病理組織型は扁平上皮癌である。口腔癌は早期発見しやすい場所に発生するにも関わらず, 5年生存率は50%前後と高くはない²⁾。その一因として口腔扁平上皮癌の特徴である, 強い局所浸潤能と高頻度に生じる所属リンパ節転移能が挙げられる。とりわけリンパ節転移の有無に関しては, 生命予後との相関を論ずる数多くのエビデンスが存在することから³⁻⁶⁾, 口腔扁平上皮癌患者の生命予後向上には, リンパ節転移を制御している主要分子の同定が重要であると考えられる。

ケモカインは好中球や単球を遊走させるサイトカイン群として見出された^{7,8)}。現在, ヒトでは45種に上るケモカインと18種のケモカインレセプターが同定されており⁹⁾, これらケモカインシステムは, リンパ球ホーミング, 白血球遊走, 炎症, 造血, 胚形成, 血管新生, human immunodeficiency virus (以下 HIV と略) の感染など多彩な機能に関与していることが明らかにされている⁷⁻⁹⁾。これら多彩な機能の中で, 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移によく似たシステムとしてリンパ球ホーミングが挙げられる。リンパ球ホーミングとは, 細胞表面にケモカインレセプターを発現しているリンパ球が, 脾臓ならびにリンパ節から産生される特異的なケモカインを利用し, 上述の二次リンパ組織へ誘導されるシステムである⁷⁻⁹⁾。我々の研究室では, 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移におけるケモカインシステムの役割につき検索してきた。その中で, 1) 咬筋内同所性移植モデルにてリンパ節転移能を有するヒト口腔扁平上皮癌細胞株, HNT, B88 がケモカインレセプター CXCR4 を特異的に発現していること¹⁰⁾, 2) CXCR4 低発現株であり, リンパ節転移を有しない口腔扁平上皮癌細胞株に CXCR4 を過剰発現させると, リンパ節転移能を獲得すること¹¹⁾, 3) 一次治療前の口腔扁平上皮癌患者の原発巣における CXCR4 の発現がリンパ節転移・浸潤度・再発率と相関していること¹²⁾を見出してきた。これら一連の研究結果は, CXCR4 を発現している口腔扁平上皮癌細胞が,

そのリガンドである間質の産生する stromal cell-derived factor (以下 SDF と略)-1 により基底膜を通過した後, 更にリンパ節間質細胞より産生される SDF-1 によりリンパ管へ侵入し, リンパ節へ誘導後着床することで, リンパ節転移が成立する可能性を示唆するものである。このリンパ節転移過程において, 癌細胞は基底膜の通過・リンパ管侵入時に少なくとも2度の形態変化を伴うとされているが, 近年, 癌細胞のこのような形態変化に際して, 上皮間葉移行 (Epithelial mesenchymal transition, 以下 EMT と略) と呼ばれるシステムが存在することが明らかにされた¹³⁾。従来 EMT は胎児の形態形成や器官形成において認められる, 上皮細胞が間葉系細胞に形質転換する現象を示していたが¹⁴⁾, 近年では癌細胞の基底膜, 血管内皮, リンパ管内皮への侵入時など, 癌細胞の浸潤・転移過程にも関与していると考えられている^{13,15)}。EMT 発生時には様々なシグナル伝達分子による EMT マーカーの発現変化を生じるが, 中でも間葉系マーカーである snail, vimentin の発現上昇と, 上皮系マーカーである cytokeratin, E-cadherin の発現減少が重要であるとされている¹³⁻¹⁵⁾。従って, 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移過程にもこのような EMT マーカーの発現変化を伴いながら EMT を生じることが予想されるが, SDF-1/CXCR4 システムを利用したリンパ節転移過程における EMT の関与は不明である。

一方, 2001年, Müller らによって, 乳癌の臓器特異的遠隔転移に SDF-1/CXCR4 システムが関与していることが報告された¹⁶⁾。以後, 多種多様な癌における本システムとリンパ節転移・遠隔転移との関連が報告されたが¹⁷⁻²²⁾, 現在のところ SDF-1/CXCR4 システムは臓器特異的遠隔転移を制御する paracrine loop として考えられている²³⁾。しかしながら, 口腔扁平上皮癌における SDF-1/CXCR4 paracrine loop は, 他部位の癌と異なり, おもにリンパ節転移を制御するシステムのように思われる。その理由として, 1) 口腔扁平上皮癌における CXCR4 の発現頻度は他部位の癌と同程度の40-60%程度認められ^{12, 16, 24-26)}, リンパ節転移の発生頻度も, CXCR4 の発現が論じられている他部位の癌と同程度の30-50%程度認められること^{24, 27-30)}, 2) 口腔扁平上皮癌における

CXCR4 の発現頻度は他部位の癌と同程度認められるにも関わらず、口腔扁平上皮癌の遠隔転移は、他部位の癌と異なり非常にまれであり、5%以下の頻度であること³¹⁻³³⁾、が挙げられる。実際、口腔扁平上皮癌においては、CXCR4 の発現と遠隔転移の関連を論じた報告は認められないことから、口腔扁平上皮癌の遠隔転移においてはCXCR4 の発現のみでは不十分であり、他の分子の関与が必要であることが予想される。臨床的に口腔扁平上皮癌において遠隔転移を生じた症例では、ほぼ全例にリンパ節転移が認められることから、口腔扁平上皮癌の遠隔転移は、転移リンパ節からの癌細胞の流入が主で起こると考えられる。従って、遠隔転移臓器へ流入後増殖可能な癌細胞は、転移リンパ節にて遺伝子発現変化を受け、異所環境における増殖能を獲得していることが予想される。Nicolson は、癌の進展に関与しているレセプター・リガンドシステムにおいて、初期では paracrine loop が、後期では autocrine loop が必要であることを提唱している^{34,35)}。実際、他部位の癌において hepatocyte growth factor (以下 HGF と略)/c-met³⁶⁾、platelet-derived growth factor (以下 PDGF と略)/PDGF レセプター³⁷⁾、transforming growth factor β (以下 TGF β と略)/TGF β レセプター³⁸⁾、autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase³⁹⁾、epidermal growth factor (以下 EGF と略)/EGF レセプター⁴⁰⁾ などのリガンド/レセプターによる autocrine loop が遠隔転移を促進することが報告されている。ケモカインシステムにおける autocrine loop の重要性を論じた報告は認められないが、上述の報告より推察すれば、口腔扁平上皮癌がリンパ節転移先で、SDF-1/CXCR4 autocrine loop を獲得し、遠隔転移に関与している可能性が考えられる。しかしながら、口腔扁平上皮癌における SDF-1/CXCR4 システムに関してはいまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌における SDF-1/CXCR4 システムの役割として、1) 転移過程における EMT の関与および2) 遠隔転移への関連性の有無を明らかにすることを目的とした。

材料ならびに方法

1) 細胞および培養法

当研究室で分離、樹立された舌扁平上皮癌患者由来の口腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞¹⁰⁾ および軟口蓋扁平上皮癌患者由来の口腔扁平上皮癌細胞株 Hnt 細胞⁴¹⁾ を用いた。これらの細胞は牛胎児血清 (以下 FCS と略, Equitech-Bio, Inc., Kerrille, TX, USA), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml ペニシリン (Invitrogen), 0.25 μ g/ml アンホテリシン B (Invitrogen) を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (以下 DMEM と略, Sigma, St. Louis, MO, USA) を増殖培養液として用い、空气中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養器内で37℃にて培養を行った。

2) 細胞形態の観察

30%コンフルエントの状態にある B88 細胞, Hnt 細胞に、10% FCS 存在下あるいは非存在下にて、リコンビナント SDF-1 α (R&D, Minneapolis, MN, USA) を最終濃度 100 ng/ml となるように添加し、72時間経過後の細胞形態変化を位相差顕微鏡 (ニコン, 東京) にて観察した。

3) 間接蛍光抗体法

プラスチックペトリ皿 (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) に B88 細胞を植え込み、血清非存在下にリコンビナント SDF-1 α にて20時間処理した。4%パラホルムアルデヒド (和光純薬, 大阪) で10分間固定し、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含まないダルベッコのリン酸緩衝液 [以下 D-PBS (-) と略記する, Sigma] で洗浄後、1% Bovine Serum Albumin (以下 BSA と略, Sigma) を含む D-PBS (-) により室温で一時間ブロッキングを行い、一次抗体として抗 vimentin 抗体 (Dako, Carpinteria, CA, USA) または抗 E-cadherin 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を室温にて1時間反応させた後、二次抗体として Alexa 594 標識した抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を1時間反応させた。最終濃度 2 μ g/ml の 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) にて5分間の核染色を行った後、Prolong Antifade (Molecular Probes) を用い封入し、それぞれの蛋白発現を蛍光顕微鏡 (ニコン) により観察した。

4) RNA 調製法

Total RNA は TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。すなわち、100 mm プラスティックペトリ皿あたり 1 ml の TRIZOL[®] にて細胞を溶解したのち、遠心し上清を回収した。その上清を 0.2 ml クロロホルム (和光純薬) で処理した後、混在する蛋白の除去を行った。得られた上清に 0.5 ml イソプロピルアルコール (和光純薬) を加え遠心した後、沈渣を 70% エタノール (和光純薬) にて洗浄、乾燥し、0.1% (容量/容量, 以下 V/V と略) ジエチルピロカルボネート水溶液 (以下 DEPC 処理水と略, Sigma) に溶解した。

5) reverse transcription polymerase chain reaction (以下 RT-PCR と略) 法

a) 定量性 RT-PCR 法

5 μ g の total RNA に 5 x first strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (Invitrogen)] を加え、65℃, 5分間加熱した後、氷中に5分間静置し、これに最終濃度がそれぞれ 5 μ M のランダムプライマー (Invitrogen), 10 μ M の dithiothreitol (Invitrogen), 500 μ M の deoxyribonucleoside 5'-triphosphates (dNTPs, 宝酒造, 草津), 10 U/ μ l の Moloney Murine Leukemia Virus 逆転写酵素 (Invitrogen) を加え、42℃, 60分間

反応させた後、95℃、5分間加熱し反応を停止させ cDNA を得た。得られた cDNA のうち 2 µl を鋳型とし、E-cadherin, vimentin, snail, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH と略) の発現を Taqman® gene expression assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて検索した。

b) 半定量性 RT-PCR 法

上述の方法により得られた cDNA に 2.5 mM dNTPs と オリゴヌクレオチドプライマーを最終濃度がそれぞれ 200 µM と 1 µM となるように、また、Ex-Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) は最終濃度が 0.05 U/µl となるように加え、上述の SDF-1 プライマーと GAPDH プライマー (GAPDH-UP, 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3'; GAPDH-DN, 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3') を用いて、半定量 RT-PCR 反応を行った。増幅された DNA 量を評価するために、2% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド (1 µg/ml; 和光純薬) にて染色し、UV 透過光下で観察、記録した。

6) ウエスタンブロット法

SDF-1 処理された B88 細胞 (プラスチックベトリ皿にて培養した) を D-PBS (-) にて洗浄後、それぞれの細胞に 100 µl の lysis buffer [20 mM Hepes (pH 8.0, 和光純薬), 1% NP-40 (Sigma), 10% glycerol (和光純薬), 2.5 mM EGTA (和光純薬), 2.5 mM EDTA (和光純薬), 1 mM PMSF (和光純薬), 10 µg/ml leupeptin (和光純薬), 2 µg/ml aprotinin (和光純薬)] を加え、室温にて 5 分静置した後、15000 x g にて遠心後、上清を回収し、タンパク質抽出標品として実験に供した。抽出タンパク質の濃度は、Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。培養細胞から調製した蛋白標品に最終濃度 5% の 2-Mercaptoethanol (Sigma) を加え、100℃、3 分間加熱処理した。50 µg の抽出蛋白を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて展開し、ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に転写後、0.05% Tween20 (Sigma)-0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中に溶解した 5% スキムミルク (和光純薬) あるいは 5% BSA にてブロッキングを行い、一次抗体として上記ブロッキング液に 1000 倍希釈した抗ヒト vimentin, 抗ヒト cytokeratin (AE1/AE3; Dako), 抗ヒト β-catenin (BD Biosciences), 抗ヒト β-actin (Sigma), 抗ヒトリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (以下 ERK と略) 1/2 または Akt/protein kinase B (以下 PKB と略; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を、二次抗体として horseradish peroxidase (以下 HRP と略) 標識抗マウスあるいはラビット IgG 抗体にて反応させた。その後、ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

7) 3D-Collagen gel assay

10% FCS 含有 DMEM に 3000 個の B88 細胞を懸濁し、最終濃度 1.5 mg/ml の rat tail collagen (3-4 mg/ml, Falcon; Becton Dickinson Labware) および 10% GF-reduced Matrigel solution (Falcon; Becton Dickinson Labware) を 0℃ で速やかに混和した。上記溶液のうち 200 µl を 24 ウェルプレート上に滴下し、溶液表面がゲル化するまで 30 分間室温で静置した。インキュベーター内で 1 時間培養後、表層に 500 µl の DMEM を添加し、24 時間培養した。以後培養液を連日交換し 4 日間培養した後、phosphatidylinositol 3 kinase (以下 PI3K と略) 阻害剤である Wortmannin (50 nM) を添加あるいは非添加した 100 ng/ml の SDF-1 あるいは、5 ng/ml の TGF-β1 (R&D) を含む培養液に連日交換し、8 日間培養後、位相差顕微鏡にて細胞形態を観察した。

8) 免疫組織化学染色法

当科において、1990 年から 1999 年の間に一次治療として放射線治療 (Co⁶⁰ による 60 Gy の外照射), 化学療法 [UFT (大鵬薬品, 東京) 300-400 mg/日の経口投与], 免疫療法 [OK-432 (中外製薬, 東京) 1-5 KE の皮下投与] を行った口腔扁平上皮癌患者 30 人の初診時生検材料ならびに外科的切除を行った転移リンパ節を用いた。3.7% ホルマリン固定後パラフィン包埋されたブロックより、4 µm のパラフィン切片を作製し、キシレン、アルコールにてパラフィンを除去した。次に Target retrieval solution (DAKO) にて 95℃、20 分、抗原賦活化を行った後、VECTASTAIN ABC kit, elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い、一次抗体として、抗ヒト SDF-1 抗体 (100 倍希釈, R&D), 抗ヒト CXCR4 抗体 (100 倍希釈, 12G5; Biosource International, Camarillo, CA, USA), 二次抗体として希釈ビオチン化抗 IgG 血清を 37℃ にて反応させた。再度 D-PBS (-) にて洗浄後、アビジン・ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体を 37℃ にて 1 時間反応させ、0.02% (V/V) H₂O₂ (和光純薬), 0.1% (W/V) diaminobenzidine tetrahydrochloride (和光純薬), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) にて発色させた後、ヘマトキシリンにて対比核染色を行い、封入し、光学顕微鏡を用いて観察した。染色の評価は、CXCR4 もしくは SDF-1 で染色された癌細胞が 25% 以上認められるものを陽性と評価した。

9) SDF-1 発現ベクターの構築法

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 由来ベクターである pEB6-CAG-MCS は、筑波大学基礎医学系薬理学、三輪佳宏博士に供与された⁴¹⁾。本ベクターは replicational origin (oriP) および、replication initiation factor (EBNA-1) が導入された extrachromosomal vector である。本ベクターに導入された遺伝子は、染色体外性に長期間維持されるため、細胞の clonal heterogeneity の問題を回避でき

るという特徴を有している。ヒト胎盤由来の cDNA を鋳型として SDF-1 に特異的なリンカープライマー, SDF-1 UP; 5'-CCGCTCGAGCGCGCCATGAACGCCAAGGTCG TG-3', SDF-1 DN; 5'-CGGAATTCCATCTTGAACCTCTT GTTTAAAGC-3', を用い, ヒト SDF-1 cDNA open reading frame (以下 ORF と略) を増幅した。増幅された SDF-1 ORF は, 5' 末端に *XhoI* サイトと 3' 末端に *EcoRI* サイトを有しており, この断片を pEB6-CAG-MCS のマルチクローニングサイトにライゲーション後, 大腸菌に形質転換した。18時間後, 出現したコロニーをランダムに12個選択し, LB 培地にて増幅後, アルカリ-SDS 法にてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを *EcoRI* および *XhoI* にて消化し断片の挿入を確認した。断片の正確性は ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

10) SDF-1 強制発現細胞の樹立

100 mm 径プラスチックペトリ皿に 5×10^6 個の B88 細胞を植え込み, 10% FCS を含む DMEM にて24時間培養後, 発現ベクター (pEB6-SDF-1) とコントロールベクター (pEB6-CAG-MCS) 各々 $5 \mu\text{g}$ ずつを B88 細胞に Superfect (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてトランスフェクションした。48時間後より, Geneticin ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$ G418; Invitrogen) 存在下に約 2 週間培養し, 出現した G418耐性クローン (SDF-1 強制発現 B88 細胞; 以下 B88-SDF-1 細胞と略, コントロール B88 細胞; 以下 mock 細胞と略) を回収し以後の実験に使用した。

11) 酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

B88-SDF-1, mock 両細胞における培養上清中の SDF-1 α 蛋白量の測定は, Quantikine kit (R&D) を用いて行った。すなわち, 100 mm 径のプラスチックペトリ皿上で対数増殖期にある B88-SDF-1 および mock 細胞を, 血清を含まない DMEM 中で48時間処理した後, Centricon (MW 3000, Millipore corporation, Bedford, MA, USA) を用いて遠心し濃縮後, Bio-Rad Protein assay を用いて蛋白定量を行った。抗 SDF-1 α モノクローナル抗体コーティングプレートに各細胞の $100 \mu\text{g}$ の濃縮培養上清と, 蒸留水にて各々の濃度に希釈したりコンビナント SDF-1 を加えて, 室温で 2 時間反応させた。各ウェルを $400 \mu\text{l}$ の wash buffer [0.05% Tween-20 を含む D-PBS (-)] で 4 回洗浄した後, HRP 標識抗 SDF-1 α モノクローナル抗体 $200 \mu\text{l}$ を加えて, 室温で 2 時間反応させた。さらに各ウェルを $400 \mu\text{l}$ wash buffer で 4 回洗浄し, テトラメチルベンゼンと過酸化水素からなる基質溶液 (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) をそれぞれ $200 \mu\text{l}$ 加えて, 室温で30分間反応させ 2 N 硫酸 $50 \mu\text{l}$ で反応を停止させた後, 450 nm にて吸光度を測定した。

12) 細胞遊走能の検証

トランスフェクタントの遊走能は, Transwell (Corning, Corning, NY, USA) を用いて検証した。すなわち, $200 \mu\text{l}$ の血清非添加 DMEM に懸濁した 5 万個の細胞を upper chamber に播種した後, lower chamber に $600 \mu\text{l}$ の血清非添加 DMEM を加えた。24時間培養後, lower chamber 底部のポリカーボネート膜に付着した細胞を綿棒にて拭き取った。膜を通過して膜裏面に付着している細胞を固定後, ヘマトキシリンエオジン染色 (以下 H-E 染色と略) し, 強拡大 ($\times 400$), 10視野における細胞数をカウントした。

13) Wound healing assay

各トランスフェクタントを密に単層培養し, 細胞上に滅菌済みのピペットチップを用いて, 一線の wound を形成した。浮遊細胞を D-PBS (-) にて洗浄し, 48時間後, wound に遊走している細胞を位相差顕微鏡にて確認した。

14) 足場非依存性増殖能の検証法

各トランスフェクタントを 1 ウェル当たり 2 ml の 0.6% アガーと混濁し, 6 ウェルプレート (Falcon; Becton Dickinson Labware) に, 細胞数 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 個の各濃度で播種した。1 時間後, 10% の FCS を含む DMEM を, 固層化したアガー上に重層し, 14日後と28日後に20個以上の細胞からなるコロニー数をカウントした。

15) in vivo における転移実験

BALB/c ノードマウス (日本クレア, 大阪) は病原微生物の非存在下で飼育され, 徳島大学動物実験ガイドラインに従って実験を行った。マウスは 8 週齢になった段階で, 各種実験に使用した。

a) リンパ節転移能の検索: 2×10^6 個の B88-SDF-1 細胞および mock 細胞をノードマウス咬筋内に同所性移植し⁴²⁾, 30日後に屠殺した。摘出した頸部リンパ節は重量測定, H-E 染色によりリンパ節転移を判定した。また, 抗ヒト cytokeratin AE1/AE3 抗体 (Dako) による免疫組織化学染色を行い, NIH image 1.63 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いてリンパ節全体に占める腫瘍細胞の割合を測定した。

b) 遠隔転移能の検索: 1×10^6 個の各種癌細胞をノードマウス静脈内に移植後, 30日で屠殺した。肺を摘出し, 摘出肺の重量測定, マクロ像の観察, H-E 染色により肺転移の有無を検索した。

c) 実験的化学療法の遠隔転移に及ぼす影響の検索: ノードマウス静脈内に 1×10^6 個の B88-SDF-1 細胞を移植した翌日より, CXCR4 選択的阻害剤である AMD3100 ($2.5 \text{ mg}/\text{kg}$; Sigma) と, コントロールとして同量の生理食塩水を連日皮内投与した。28日後に一

部屠殺し、摘出した右肺組織をH-E染色に、左肺組織はTRIZOL[®]を用いてtotal RNAを抽出後、ヒト、マウスに共通した上流のプライマー cGAPDH-UP; 5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' と、ヒト特異的な下流のプライマー hGAPDH-DN; 5'-GGCATTGCTGATGATCTTGAGGCT-3', あるいはマウス特異的な下流のプライマー mGAPDH-DN; 5'-TGCATTGCTGACAATCTTGA GTGA-3' により RT-PCR 反応を行い、分子レベルでの肺転移の有無を検証した。また、残りのヌードマウスは50日後まで飼育し、その間の体重変動ならびに生存率を検索した。

16) 細胞増殖能の評価法

AMD3100 が B88-SDF-1 および mock 細胞の増殖能に与える影響は 3-(3,4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (以下 MTT と略, Sigma) を用いて検索された。すなわち、96ウェルマイクロプレート (Falcon; Becton Dickinson Labware) に 1×10^4 個の細胞を播種し、翌日から AMD3100 を 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し培養を開始した。24時間、48時間細胞を培養した後、最終濃度が 1 mg/ml となるように MTT 溶液を加え、37°C で 4 時間反応させた後、形成された MTT formazan を 100 μl の dimethylsulfoxide (DMSO, 和光純薬) で溶解し、OD 590 nm にて吸光度を測定することで生細胞数を評価した。

17) cDNA マイクロアレイ

B88-SDF-1 細胞と mock 細胞における遺伝子発現変化の包括的解析は、血清非添加状態にて48時間培養された両細胞より抽出された total RNA を逆転写して作製された cDNA を用いて行われた。この cDNA を Cy3 単色蛍光標識後、29098個のヒト全遺伝子を搭載したマイクロアレイ (Applied Biosystems ヒトゲノムサーベイマイクロアレイ V2.0) にハイブリダイズした。蛍光強度にてサンプル間での遺伝子発現の差異を数値化して得られたデータを Applied Biosystems 1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザにて解析した (株式会社 GENECOM, 愛媛)。

18) 統計学的処理

全ての統計学的処理には Stat View 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を使用した。異なるグループの平均値の間における有意差検定は、one-way ANOVA を用い、 $P < 0.05$ で有意と評価した。対応のある 2 群の比較には Wilcoxon signed rank test を用い、 $P < 0.05$ で有意と評価した。原疾患特異的な生存率の検討は Kaplan-Meier 法により、予後因子の単変量解析には logrank test を用い、 $P < 0.05$ で有意と評価した。

結 果

1) SDF-1/CXCR4 システムによる口腔扁平上皮癌細胞株の形態変化

口腔扁平上皮癌細胞の転移過程における細胞形態変化に、SDF-1/CXCR4 システムが関与しているか検索するために、CXCR4 発現株である B88 細胞および HNt 細胞に SDF-1 を 100 ng/ml で添加し、血清飢餓状態で培養した。その結果、細胞は48時間後より分散し始め、72時間後には B88 細胞 (図 1 a, b) のほとんどが、HNt 細胞 (図 1 c, d) では約30%において紡錘状の間葉系細胞様変化を示した。なお、CXCR4 低発現株である IH 細胞を用いた場合、このような形態変化は観察されなかった (データには示していない)。以上より、SDF-1/CXCR4 システムは、EMT 様変化を誘導する可能性が示唆された。

2) SDF-1/CXCR4 システムによる EMT マーカーの発現変化

B88 細胞に SDF-1 を添加し、血清飢餓状態で培養することにより、各種 EMT マーカーのタンパク質の発現変化を検索した。その結果、間葉系マーカーである vimentin の発現上昇 (図 2 a, b) と、上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下 (図 2 c, d) が認められた。そこで、SDF-1/CXCR4 システムによる EMT マーカー mRNA の発現変化を定量性 RT-PCR 法で検証したところ、B88 細胞において、E-cadherin mRNA の発現低下と、間葉系マーカーである snail, vimentin mRNA の発現上昇が認められた (図 3 a)。一方、HNt 細胞におけるこれらマーカーにおける mRNA 発現は、同様な変動を示したが B88 細胞と比較してその変動はわずかであった (図 3 b)。タンパク質レベルでは上皮系マーカーである cytokeratin と β -catenin の発現低下が認められる一方で、vimentin の発現は上昇していた (図 3 c)。以上より SDF-1/CXCR4 システムは EMT を誘導する可能性が強く示唆された。

3) SDF-1/CXCR4 システムによる EMT シグナル伝達経路

既に我々は B88 細胞において SDF-1/CXCR4 システムが ERK1/2 および Akt/PKB シグナル伝達経路を活性化することを見出している¹⁰⁾。SDF-1/CXCR4 システムにより誘導される EMT に関与するシグナル伝達経路を同定する目的で、SDF-1 による vimentin の発現上昇に対する MEK 阻害剤 (U0126) および、PI3K 阻害剤 (Wortmannin) の影響を検証した。ERK1/2 および Akt/PKB は SDF-1 処理により速やかに活性化されたが、その活性化は各々のキナーゼ阻害剤処理により完全に阻害された (図 4)。一方、SDF-1 処理による vimentin タンパク質の発現上昇は Wortmannin により阻害されたが、U0126 では阻害されなかった (図 4)。そこで、3D-collagen gel assay によ

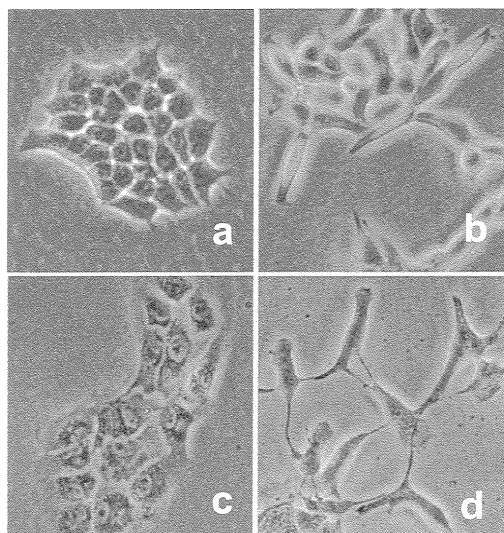


図1 SDF-1 処理による B88 細胞および HNT 細胞における細胞形態の変化

血清飢餓状態下に B88 細胞 (a, b) および HNT 細胞 (c, d) に SDF-1 を添加し, 72 時間培養した後, 細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。B88 細胞, HNT 細胞ともに, SDF-1 処理にて間葉系細胞様の紡錘状の変化を示した。B88 細胞における SDF-1 未処理 (a), 処理 (b), HNT 細胞における SDF-1 未処理 (c), 処理 (d) を示す。実験は 2 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

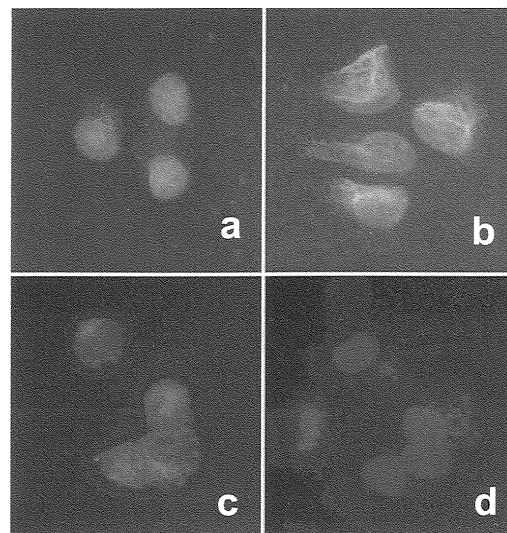


図2 SDF-1 処理による B88 細胞における EMT マーカーの発現変化

血清飢餓状態下に B88 細胞を SDF-1 処理 (b, d) あるいは未処理 (a, c) の状態下に培養し, 72 時間後, 細胞を染色し蛍光顕微鏡下で観察した。SDF-1 処理 (b) による vimentin (赤) の発現は, SDF-1 未処理 (a) に比較して, 上昇していた。また, SDF-1 処理 (d) による E-cadherin (赤) の発現は, SDF-1 未処理 (c) に比較して減弱していた。なお, 核染色を DAPI (青) にて行った。実験は 2 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

る細胞形態変化に及ぼす Wortmannin の効果を検討した。その結果, SDF-1 処理後の B88 細胞は, 代表的な EMT 誘導因子である TGF- β 1 による処理後と同様に, EMT 様変化を示唆する突起形成をしつつ, ゲル内における進展傾向を示した (図 5 a-f)。しかしながら, SDF-1 処理によって生じた B88 細胞の突起形成は, Wortmannin 処理により著明に抑制された (図 5 g, h)。以上の結果より, ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における SDF-1/CXCR4 システムはリンパ節転移を促進するのみならず, PI3K-Akt シグナル伝達経路の活性化を介して, リンパ節転移過程における EMT に作用している可能性が示唆された。

4) 口腔扁平上皮癌患者の原発巣ならびに転移リンパ節における SDF-1 および CXCR4 の発現

既に我々の研究室では, 口腔扁平上皮癌の原発巣における SDF-1 の発現がほとんど認められないことを見出している^{10, 12)}。そこで, 口腔扁平上皮癌細胞は転移進展過程において SDF-1/CXCR4 autocrine loop を獲得することで転移能を亢進させるという仮説の下, リンパ節転移を伴う口腔扁平上皮癌患者 30 症例における原発巣および転移リンパ節の癌細胞における SDF-1 と CXCR4 蛋白の発現を検索した (図 6 a-d)。その結果, CXCR4 の発現は原発巣内および転移リンパ節内の癌細胞におい

て同等に認められたが (図 6 b, d, 表 1), SDF-1 の発現は原発巣内において, 30 症例中 2 症例に陽性であったのに対し, リンパ節転移巣では 30 症例中 16 症例に陽性所見が認められ, リンパ節転移巣内の癌細胞における SDF-1 の陽性頻度は有意に上昇していた (図 6 a, c, 表 1)。その中でも, リンパ節転移巣において SDF-1 と CXCR4 共発現している癌細胞は, 紡錘形様を呈しているものが散見され, EMT 様変化を生じていることが示唆された (図 6 c, d)。SDF-1 と CXCR4 が共に陽性である転移リンパ節症例数は 30 症例中 14 症例であり, リンパ節転移を有する口腔扁平上皮癌のほぼ半数において SDF-1/CXCR4 autocrine loop を獲得している可能性が示唆された。そこで, SDF-1/CXCR4 の発現と口腔扁平上皮癌患者の生存率の関係を検索したところ, SDF-1 陽性群における 5 年生存率は 25.0% であり, SDF-1 陰性群の 71.4% と比較して転帰は有意に不良であった ($P < 0.05$, 図 6 e)。さらに, 画像上肺転移が確認された 6 症例においては, リンパ節転移巣の癌細胞における SDF-1 の発現はすべて陽性所見を示した (表 1)。また, 原発巣における CXCR4 の発現と 5 年生存率の関係を検索したところ, CXCR4 陰性群で 71.4%, CXCR4 陽性群で 39.1% であり, CXCR4 陽性群において 5 年生存率は有意に低下していた ($P < 0.05$, データには示していない)。

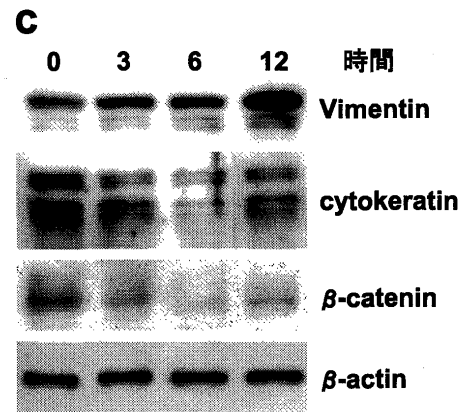
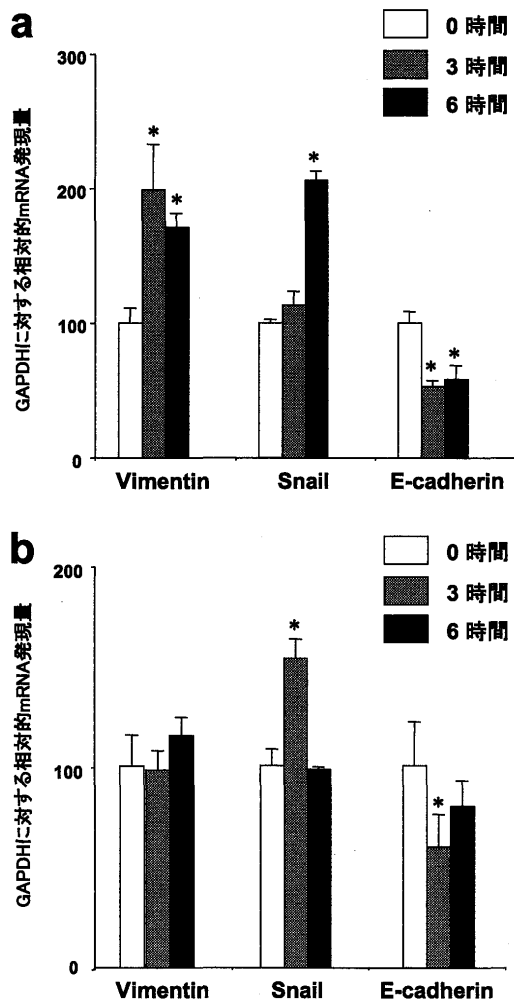


図3 SDF-1 処理による B88 細胞および HNt 細胞における EMT マーカーの発現変動
SDF-1 処理後の B88 細胞 (a) あるいは HNt 細胞 (b) における EMT マーカー (vimentin, snail, E-cadherin) mRNA の発現を定量性 RT-PCR を用いて検索した。SDF-1 処理後の *E-cadherin* mRNA の発現低下と, *snail*, *vimentin* mRNA の発現上昇が認められた。(c) SDF-1 処理後の B88 細胞における EMT マーカー (vimentin, cytokeratin, β-catenin) タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて検索した。cytokeratin と β-catenin の発現低下が認められる一方で, vimentin の発現は上昇していた。全ての実験は 3 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

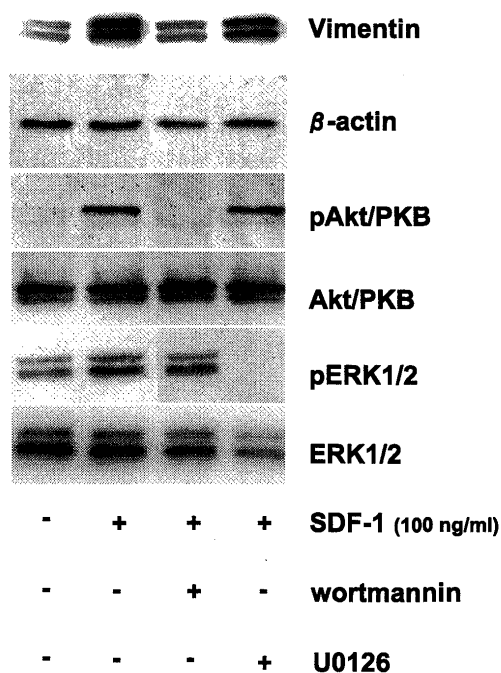


図4 SDF-1 処理による vimentin タンパク質の発現上昇におよぼすキナーゼ阻害剤の影響
vimentin, β-actin の検索には, 血清飢餓状態下に B88 細胞に SDF-1 を添加し (lane 2-4), 同時に Wortmannin (lane 3) あるいは U0126 (lane 4) を添加後, 12 時間培養した。Akt/PKB あるいは ERK1/2 の検索には, 血清飢餓状態で一晚培養後, Wortmannin (lane 3) あるいは U0126 (lane 4) 存在下に 45 分培養した後, SDF-1 にて 10 分間の処理を行った (lane 2-4)。lane 1 は SDF-1 未処理を示している。処理後に細胞を溶解し抽出した蛋白を用い, ウエスタンブロットを行った。Akt/PKB および ERK1/2 の SDF-1 による活性化は, 各々のキナーゼ阻害剤処理により完全に阻害された (lane 3 の 3 段目, lane 4 の 5 段目)。一方, SDF-1 処理による vimentin タンパク質の発現上昇は Wortmannin により阻害されたが (lane 3 の 1 段目), U0126 では阻害されなかった (lane 4 の 1 段目)。全ての実験は 2 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

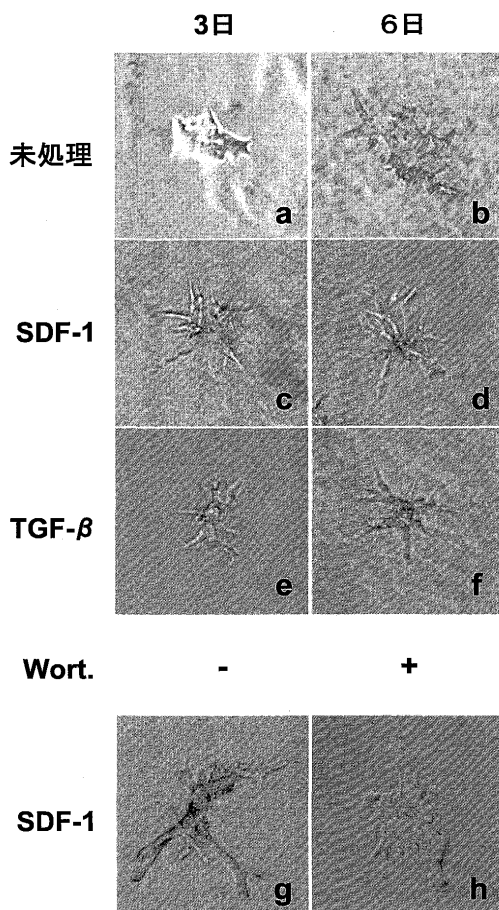


図5 SDF-1 処理による B88 細胞の形態変化におよぼす Wortmannin の影響

B88 細胞を rat tail collagen と 10% GF-reduced Matrigel solution の混和溶液内に包埋し、1 日間培養した後、SDF-1 (c, d) あるいは TGF-β1 (e, f) により 3 日間あるいは 6 日間処理し、位相差顕微鏡下に観察した。SDF-1 (c, d) あるいは TGF-β1 (e, f) 添加により B88 細胞は突起形成し、ゲル内の進展傾向を示した。(h, g) B88 細胞を、SDF-1 処理と同時に Wortmannin 添加 (h) あるいは未添加 (g) の状態で 6 日間培養し、位相差顕微鏡下に観察した。Wortmannin 添加により SDF-1 による B88 細胞の突起形成は抑制された。全ての実験は 2 回繰り返して行い、同様の結果を得た。

5) 口腔扁平上皮癌細胞における SDF-1/CXCR4 autocrine loop による表現形質の変化

SDF-1/CXCR4 autocrine loop が、口腔扁平上皮癌細胞の転移ならびに予後不良因子として関与していることが示唆されたため、CXCR4 高発現株である B88 細胞に、SDF-1 を強制発現させた安定発現株 (以下 B88-SDF-1 細胞と略) を樹立した。その結果、B88-SDF-1 細胞において、RT-PCR 法にて *SDF-1* mRNA の発現上昇と、ELISA 法にて SDF-1 蛋白の大量の産生が認められた (図 7 a, b)。上述のごとく、既に我々の研究室では、外因性に

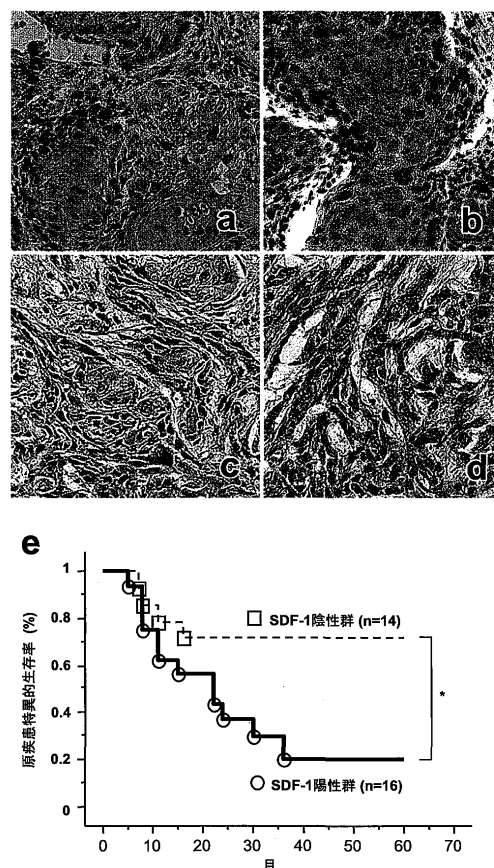


図6 口腔扁平上皮癌患者の原発巣および転移リンパ節における SDF-1, CXCR4 の発現

同一患者における原発巣ならびに転移リンパ節巣での SDF-1 および CXCR4 の発現を免疫組織化学染色法により検索した。原発巣における SDF-1 (a)、原発巣における CXCR4 (b)、転移リンパ節における SDF-1 (c)、転移リンパ節における CXCR4 (d) の各発現を示す。癌細胞の SDF-1 発現は原発巣では認められないが (a)、転移リンパ節の癌細胞では強陽性を示した (c)。(e) 口腔扁平上皮癌患者の転移リンパ節における SDF-1 の発現と生存率の関係を示す。転移リンパ節における SDF-1 陽性群は、陰性群と比較して 5 年生存率が有意に低下していた (*、 $P < 0.05$)。

添加した SDF-1 が、ERK1/2, Akt/PKB を活性化することを明らかにしている¹⁰⁾。そこで、B88-SDF-1 細胞における ERK1/2, Akt/PKB の活性化を検索した。その結果、血清飢餓状態で培養した B88-SDF-1 細胞において、ERK1/2, Akt/PKB がそれぞれ恒常的に活性化されていた (図 7 c)。以上より B88-SDF-1 細胞が SDF-1/CXCR4 autocrine loop を獲得していることが示唆された。次に、B88-SDF-1 細胞の in vitro における表現形質の変化を検索した。B88-SDF-1 細胞は、mock 細胞と比較して、足場依存性増殖能に変化を認めなかったが (データには

表1 口腔扁平上皮癌患者30例の原発巣, リンパ節転移巣における SDF-1/CXCR4 の発現と転帰

No.	年齢/性別	SDF-1		CXCR4		生存日数 (月/転帰)	遠隔転移
		原発巣	転移リンパ節	原発巣	転移リンパ節		
1	68/男	-	+	+	+	36/死亡	-
2	76/男	-	-	+	+	16/死亡	-
3	73/女	-	+	-	+	8/死亡	+
4	66/男	-	-	-	+	60/生存	-
5	70/女	-	+	+	+	11/死亡	+
6	64/男	-	-	-	+	7/死亡	-
7	78/男	-	-	+	+	8/死亡	-
8	90/女	-	+	+	+	8/死亡	+
9	66/女	-	+	+	+	29/生存	-
10	71/女	-	-	+	-	67/生存	-
11	74/男	-	+	-	+	30/死亡	-
12	61/男	-	-	-	-	41/生存	-
13	73/男	-	+	-	-	8/死亡	-
14	71/男	-	-	-	+	11/死亡	-
15	76/男	+	+	+	+	60/生存	-
16	64/男	-	+	+	+	24/死亡	+
17	83/女	-	-	+	+	60/生存	-
18	76/女	-	-	+	-	60/生存	-
19	59/男	-	-	+	+	60/生存	-
20	76/男	-	+	+	+	60/生存	-
21	67/女	-	+	-	+	22/死亡	-
22	74/男	-	-	+	-	60/生存	-
23	74/女	-	+	+	+	32/生存	-
24	75/男	+	+	+	+	15/死亡	-
25	73/女	-	+	-	-	5/死亡	-
26	80/男	-	+	+	+	11/死亡	+
27	62/女	-	+	+	+	22/死亡	+
28	71/男	-	-	+	-	35/生存	-
29	70/男	-	-	+	+	60/生存	-
30	59/男	-	-	+	+	26/生存	-
陽性症例数		2	16*	21	23		6

-, 陰性; +, 陽性.

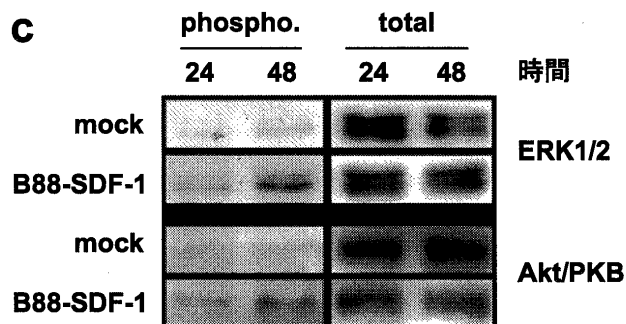
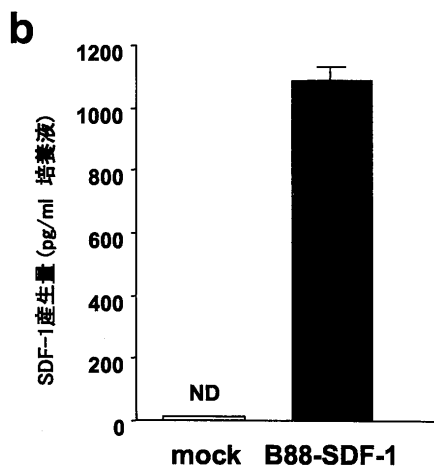
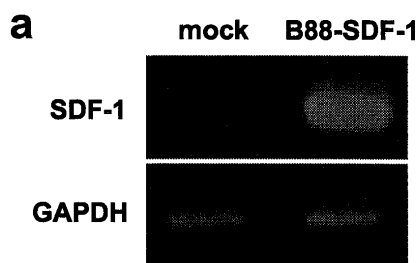
*, SDF-1陽性症例が有意に増加 ($P<0.001$, Wilcoxon signed rank testによる)

図7 SDF-1 強制発現細胞 (B88-SDF-1 細胞) の樹立
B88 細胞に SDF-1 発現ベクターを導入後, 樹立された mock 細胞および B88-SDF-1 細胞における遺伝子発現変化を検索した。(a) *SDF-1* mRNA と *GAPDH* mRNA の発現を RT-PCR 法により検索したところ, B88-SDF-1 細胞において SDF-1 の高発現が認められた。(b) 培養上清中に産生された SDF-1 蛋白量を ELISA 法を用いて検索したところ, B88-SDF-1 細胞において SDF-1 の大量の産生が認められた。(c) 各細胞を血清飢餓状態で培養後, 抽出された蛋白を用い, ウェスタンブロット法により, ERK1/2 および Akt/PKB の活性化を検索した。B88-SDF-1 細胞において, ERK1/2 (左 2 段目), Akt/PKB (左 4 段目) の恒常的活性化が認められた。

示していない), 細胞遊走能 (図 8 a, b) と, 足場非依存性増殖能 (図 8 c, d) が著明に亢進していた。なお, B88 細胞より CXCR4 の発現が7.5倍低い HNT 細胞^{10, 12)} を用いて同様の検証を行ったが, HNT-SDF-1 細胞の in vitro における表現形質の変化は軽度であった。このことより, SDF-1/CXCR4 autocrine loop の成立には, 高いレベルの CXCR4 の発現が必要であることが示唆された。

6) in vivo における B88-SDF-1 細胞の転移能の検索

口腔扁平上皮癌細胞の SDF-1/CXCR4 autocrine loop に

よって生じる表現形質の変化が転移能に与える影響を検証するために, B88-SDF-1 細胞および mock 細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植した。形成された原発巣の腫瘍サイズは, 両群においてほとんど差はなく, 共に病理組織学的な頸部リンパ節転移が認められた。しかしながら, B88-SDF-1 細胞移植マウスにおけるリンパ節重量は mock 細胞移植マウスと比較して有意に増加しており (図 9 a), 転移リンパ節数とリンパ節内の転移細胞数も有意に増加していた (図 9 b, 表 2)。このヌードマウス咬筋内同所性移植モデルでは, 腫瘍の増大に伴って気道閉塞ならびに食事摂取困難を生じ, 長期生存が困難

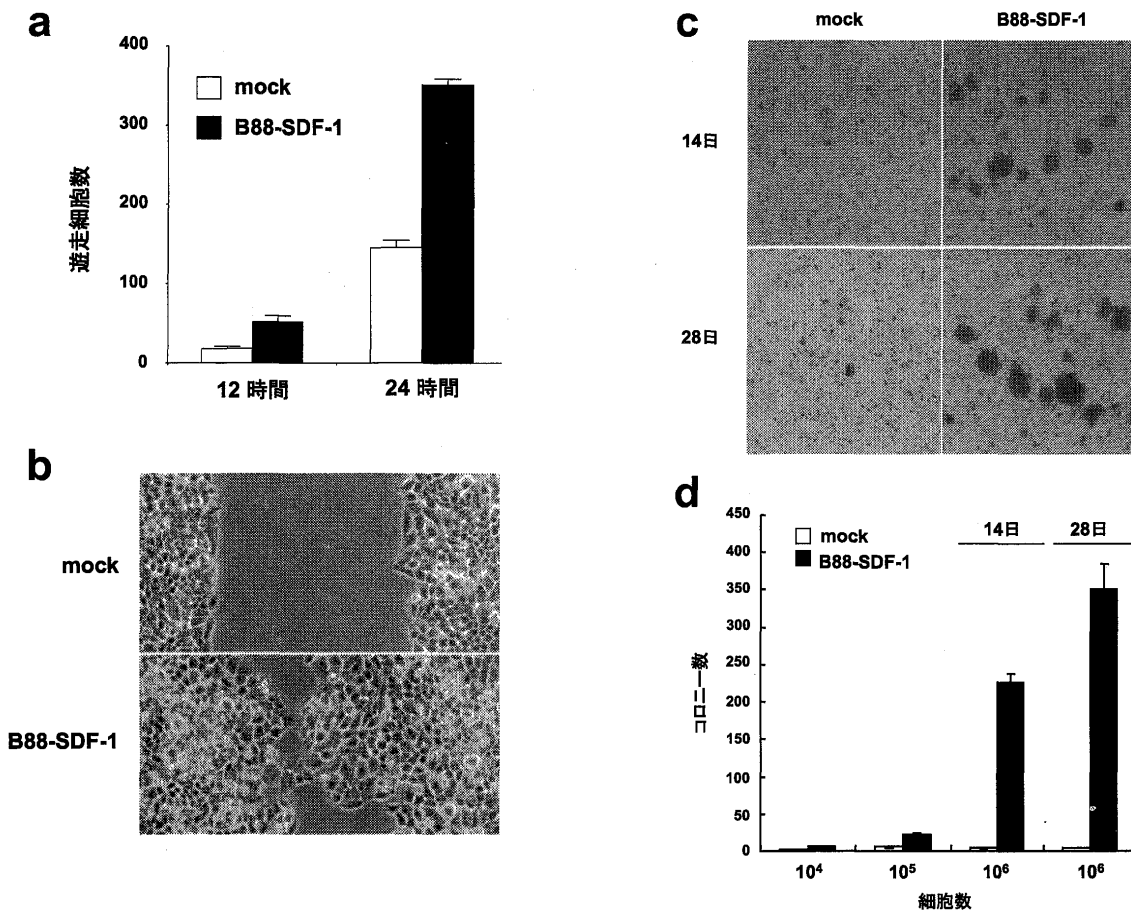


図 8 B88-SDF-1 細胞における遊走能および足場非依存性増殖能の検証

(a) 5×10^4 個の mock 細胞および B88-SDF-1 細胞を upper chamber に播種後, 12時間あるいは24時間後に染色し, 膜の小孔を通過し底面に付着している細胞数をカウントした。B88-SDF-1 細胞 (黒) の遊走能は mock 細胞 (白) に比較して有意に亢進していた ($P < 0.001$)。 (b) 密な単層培養状態の mock 細胞および B88-SDF-1 細胞に対し, 一線の創を形成し, 48時間後の創部への遊走能を観察した。mock 細胞 (上段) に比較して, B88-SDF-1 細胞 (下段) において著しい細胞遊走能の亢進が認められた。 (c) mock 細胞および B88-SDF-1 細胞を 0.6% アガーと混濁し, 6 ウェルプレートに, 細胞数 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 個の各濃度で播種した。10% の FCS を含む DMEM を, 固層化したアガー上に重層し, 14日後 (上段) と28日後 (下段) の状態を位相差顕微鏡下に観察した。B88-SDF-1 細胞におけるコロニー数の増加が観察された (弱拡大; 400倍)。 (d) (c) において20個以上の細胞からなるコロニー数をカウントしたものをグラフ化して示す。 1×10^5 , 1×10^6 個の各濃度において B88-SDF-1 細胞ではコロニー数が有意に増加していた ($p < 0.001$)。全ての実験は2回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

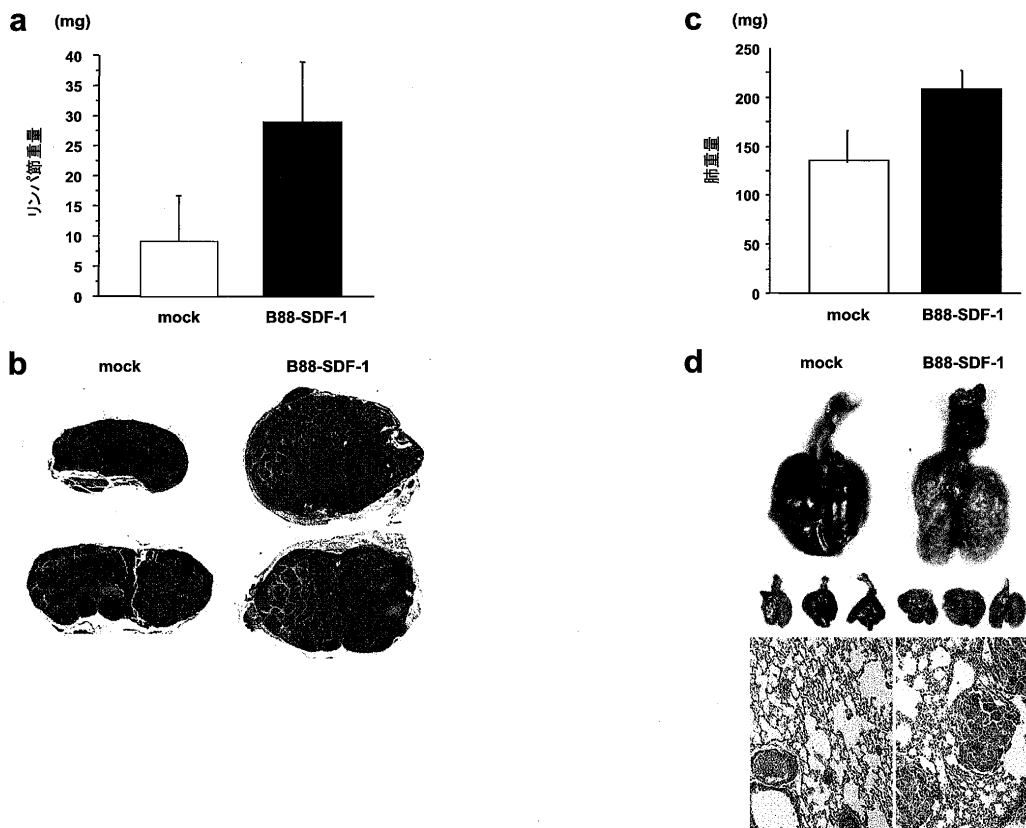


図9 B88-SDF-1細胞における転移能の検索

(a, b) 2×10^6 個の mock 細胞あるいは B88-SDF-1 細胞をヌードマウス咬筋内に移植し, 30日後に摘出したリンパ節を解析した。(a) 頸部リンパ節における重量の平均を示す。B88-SDF-1 細胞担癌マウスにおいてリンパ節重量が有意に増加していた ($P < 0.01$)。 (b) リンパ節における転移癌細胞の存在を, cytokeratin AE1/AE3 抗体による免疫染色法を用いて検証した。茶色で染色された癌細胞の領域は, B88-SDF-1 細胞担癌マウスにおいて増加していた。(c, d) mock 細胞あるいは B88-SDF-1 細胞 (1×10^6 個) をヌードマウス静脈内に移植し, 30日後に摘出した肺組織を解析した。(c) 移植マウスから摘出された肺組織の重量を示す。B88-SDF-1 細胞移植マウスにおいて肺重量は有意に増加していた ($P < 0.01$)。 (d) mock 細胞移植群 (左) および B88-SDF-1 細胞移植群 (右) の肺におけるマクロ像 (上中段) と, H-E 染色像 (下段) を示す。B88-SDF-1 細胞移植群における肺において, 肉眼的に多数の小結節が認められ (右上中段), 病理組織学的に転移巣であることが確認された (右下段)) 段んいて, 肉眼的に多数の小結節が認められ (右上中段) 病理組織学的に転移巣であることが確認された (右下段)。

表2 mock 細胞, B88-SDF-1 細胞移植マウスにおける転移リンパ節の比較

細胞	マウス番号	転移細胞数(%)	転移リンパ節数
B88-SDF-1	1	67.74*	2
	2	54.94	1
	3	51.59*	2
	4	62.34*	2
	5	64.04	1
mean \pm SD		60.29 \pm 6.692†	1.6 \pm 0.548 §
mock	1	31.25	1
	2	45.01	1
	3	31.78	1
	4	32.30	1
	5	ND	0
mean \pm SD		35.08 \pm 6.630	0.8 \pm 0.447

*2個のリンパ節の平均値を示す。ND, 転移リンパ節を認めない。

† $P < 0.01$, § $P < 0.05$, mock細胞と比較して有意差を認める。

表3 B88-SDF-1 細胞において発現上昇していた遺伝子

遺伝子番号	機能	発現上昇度*
232639	unknown	492
118190	unknown	79
233470	unknown	75
198005	phosphatase	66
163849	G-protein coupled receptor	46
233864	unknown	44
114896	non-receptor serine /threonine protein kinase	40
142147	monooxygenase	38
231119	unknown	37
145077	unknown	36

*、B88-SDF-1細胞における発現量をmock細胞における発現量で割り算した値

表4 B88-SDF-1 細胞において発現減少していた遺伝子

遺伝子番号	機能	発現上昇度*
142089	Actin family cytoskeletal protein	0.00059
715908	unknown	0.00096
235158	Glycosyltransferase;Transferase	0.0012
343506	Non-receptor serine/ threonine protein kinase	0.00124
160620	Protease;Serine protease	0.00172
226807	unknown	0.00201
674650	unknown	0.00282
197093	unknown	0.00289
235282	unknown	0.00405
214264	unknown	0.00442

*、B88-SDF-1細胞における発現量をmock細胞における発現量で割り算した値

であることから、遠隔転移の検出は困難である。実際、今回の30日間の実験系では病理組織学的な遠隔転移を検出することはできなかった。そこで、SDF-1/CXCR4 autocrine loop による遠隔転移への影響を検索する目的で、腫瘍細胞のヌードマウス静脈内移植による遠隔転移実験を行った。その結果、B88-SDF-1 細胞移植マウスの肺重量は、mock 細胞移植群と比較して有意に増加していた (図9c)。さらに、B88-SDF-1 細胞移植群における全例の肺において、肉眼的に多数の小結節が認められ (図9d 右上中段)、この結節が転移巣であることが病理組織学的に確認された (図9d 右下段)。対照的に、SDF-1/CXCR4 paracrine loop を有すると考えられる mock 細胞移植群において、肺転移は全く認められなかった (図9d 左)。以上より、口腔扁平上皮癌細胞のリンパ節転移には SDF-1/CXCR4 paracrine loop が必要であるが、遠隔転移には autocrine loop が必要である可能性が示唆された。

7) B88-SDF-1 細胞における遺伝子発現変化

口腔扁平上皮癌細胞の遠隔転移には SDF-1/CXCR4 autocrine loop の形成が重要である可能性が示唆されたが、癌細胞の挙動を決定する主要分子はその下流に存在すると考えられる。そこで次に、B88-SDF-1 細胞と mock 細胞における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイ法により検索した。その結果、B88-SDF-1 細胞において発現上昇あるいは低下している418個の遺伝子を同定したが、これら遺伝子のほとんどが、既存の転移関連分子に属さないものであった (表3, 4)。B88-SDF-1 細胞において発現上昇していた3遺伝子を RT-PCR 法にて再検索したところ、その発現は B88-SDF-1 細胞において著明に上昇していた (図10a)。

8) SDF-1/CXCR4 autocrine loop に対する CXCR4 阻害剤、AMD3100の影響

AMD3100は、CXCR4 分子の171, 182, 193, 262番目のアスパラギン酸に特異的に結合することで、SDF-1 の結合や HIV 感染を阻害する薬剤⁴³⁾、現在 HIV 治療薬、造血性幹細胞を動員する際の治療薬として臨床試験中の薬剤である^{44, 45)}。この AMD3100 を用いて、アレイ同定遺伝子群が SDF-1/CXCR4 autocrine loop によって変動する真の遺伝子群であるか否かを検索した。その結果、AMD3100 処理により B88-SDF-1 細胞における198005 および163849 遺伝子の発現は著明に抑制された (図10a)。そこで、AMD3100 を用いて、B88-SDF-1 細胞における表現形質の変化が、SDF-1/CXCR4 autocrine loop の直接的効果によるものかを検討した。まず AMD3100 の細胞増殖に与える影響を検索したが、AMD3100 は mock 細胞および B88-SDF-1 細胞の増殖に影響を与えなかった (図10b)。次に細胞遊走能に与える影響について検索したところ、B88-SDF-1 細胞の遊走能の亢進は、AMD3100 処理により mock 細胞とほぼ同レベルにまで減弱された (図10c)。そこで、B88-SDF-1 細胞の遠隔転移に対する AMD3100 の影響につき、静脈内移植モデルを用いて検証したところ、AMD3100 投与により肺組織内での腫瘍巣の著明な減少が確認できた (図10d 上段)。また、ヒト特異的 GAPDH プライマーを用い、転移細胞の有無を RT-PCR 法にて解析したところ、AMD3100 処理群においては、4 匹中3匹でヒト特異的 GAPDH の発現が確認されず、B88-SDF-1 細胞が肺に存在しないことが分子レベルで明らかとなった (図10d 下段)。また、同時に長期飼育 (50日) を行い体重変動、生存能に与える AMD3100 の影響を検証したところ、AMD3100 処理によって有意な体重減少の抑制 (図10e) と生存率の延

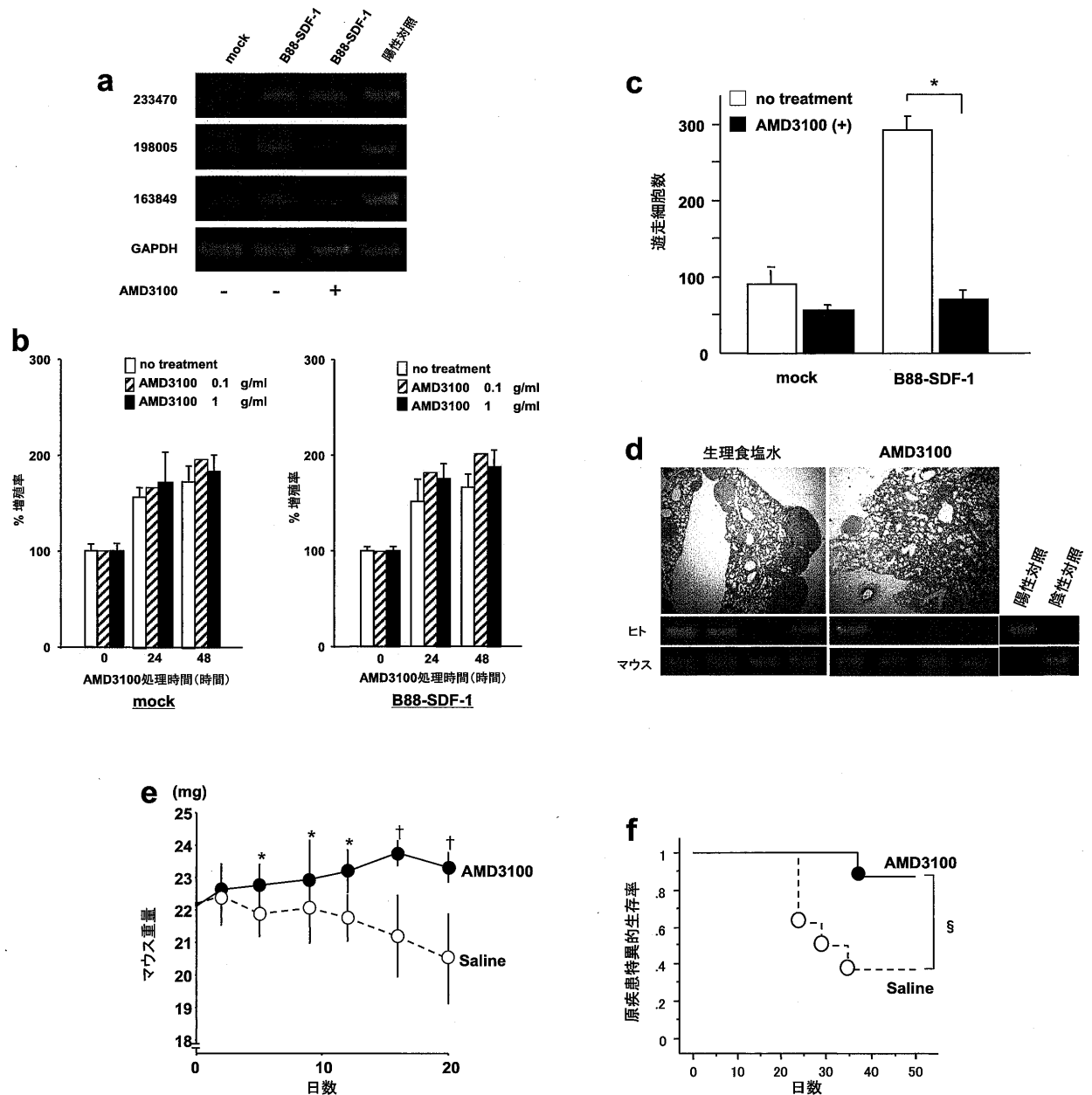


図10 B88-SDF-1細胞における遺伝子発現と、AMD3100によるB88-SDF-1細胞の遊走能と転移能におよぼす影響
 (a) cDNA マイクロアレイ法により B88-SDF-1 細胞において発現上昇していた遺伝子のうち、233470 (一段目)、198006 (二段目)、163849 (三段目) の3遺伝子に対して、各種プライマーを用い RT-PCR 法による検索を行った。3遺伝子の発現はいずれも mock 細胞 (lane 1) と比較して B88-SDF-1 細胞 (lane 2) において上昇しており、AMD3100 処理は、198006 (二段目)、163849 (三段目) 遺伝子において、その発現を減弱した (lane 3)。陽性対照は、胎盤由来 cDNA を用いた結果を示している。(b) AMD3100 の細胞増殖能に与える影響を MTT 法により検証した。AMD3100 は、mock 細胞 (左)、B88-SDF-1 細胞 (右) のいずれの増殖にも影響を与えなかった。(c) migration assay により AMD3100 の細胞遊走能に与える影響を検索した。AMD3100 は B88-SDF-1 細胞の遊走能を有意に減弱させた ($p < 0.0001$)。(d-f) B88-SDF-1 細胞 (1×10^6 個) をヌードマウス静脈内に移植後、生理食塩水あるいは AMD3100 を連日皮下投与した。(d) 上段には30日後に屠殺したヌードマウスから摘出した肺組織における H-E 染色像を、下段には肺組織由来 RNA よりヒトおよびマウスに特異的な GAPDH プライマーを用いて RT-PCR を行った結果を示す。AMD3100 処理群 (右) では、生理食塩水処理群 (左) に比較して、肺転移が病理組織学的にも分子レベルでも著明に抑制されていた。(e) AMD3100 処理群 (黒)、生理食塩水処理群 (白) における体重変化を、0、2、5、9、12、16、20日後に測定し、グラフ化した結果を示す。AMD3100 はマウスの体重減少を有意に抑制した (*、 $P < 0.05$; †、 $P < 0.0001$)。(f) AMD3100 処理群 (黒)、生理食塩水処理群 (白) の50日間における原疾患特異的生存率の変化を Kaplan-Meier 法を用いて検索した。AMD3100 はマウスの生存率を有意に延長した (§、 $P < 0.05$)。

長が認められた (図10f)。以上より B88-SDF-1 細胞は SDF-1/CXCR4 autocrine loop 依存的に *in vitro*, *in vivo* における表現形質を変化させていることが示唆された。

考 察

EMT は1982年に Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程、特に心臓や腎臓または口蓋形成における重要性がこれまでに明らかにされている⁴⁶⁾。一方、近年明らかにされた癌細胞における EMT は、浸潤・転移過程において一時的に観察される癌細胞自身が間葉系細胞様の形態変化を生じる現象である^{13,15)}。このような EMT 誘導の分子機構はこれまでに、*in vitro* の培養細胞を用いた実験で明らかにされてきた。例えば Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞は線維芽細胞由来の培養上清で数石状の形態から線維芽細胞様の形態に変化することが明らかにされている⁴⁷⁾。しかしながら、このような *in vitro* における EMT は、血清中の基質や培養条件に左右されることが多く、観察されるのはごく限られた細胞においてのみであるとされている¹³⁾。実際、本研究で観察された EMT 様変化も、ヒト口腔扁平上皮癌細胞である B88 細胞および HNT 細胞を SDF-1 により刺激することで、血清飢餓状態で培養細胞同士が密集して接触していないという条件下においてのみ観察可能であり、この変化は SDF-1 除去あるいは血清の添加により速やかに回復した。本研究において *in vitro* における EMT が、限られた条件下でしか観察されなかった理由は明らかではないが、血清中の EMT 阻害因子の存在や SDF-1/CXCR4 システムにより阻害できない細胞接着分子の存在、細胞接触により誘導される EMT 阻害分子の存在などが考えられた。本研究では、SDF-1 処理により B88 細胞、HNT 細胞ともに EMT マーカーの発現変化を伴った線維芽細胞様の形態変化を呈したが、HNT 細胞における変化は軽度であった。その理由として、上述のごとく、*in vitro* における EMT が細胞特異的な変化であることも一因かもしれないが、HNT 細胞における CXCR4 の発現が B88 細胞と比較して約7.5倍も低レベルであることや^{10,12)}、HNT 細胞の多様性により、個々の細胞における CXCR4 の発現量が異なっている可能性なども考えられる。そのため、HNT 細胞では SDF-1 によって誘導された細胞内シグナル伝達効率が低く、EMT マーカーの発現変化を伴うには不十分であったのかもしれない。また、HNT 細胞においては存在せず、B88 細胞において SDF-1/CXCR4 システムにより EMT を増強させるような経路が存在しているのかもしれない。例えば、HGF/c-met による autocrine システムにより EMT を生じない正常乳腺上皮細胞が、活性化 M-Ras により形質転換することで EMT を誘導できることも報告されている⁴⁸⁾。

EMT が惹起された癌細胞は線維芽細胞様の性質を獲

得しており、細胞間接着が減弱することで細胞運動が活性化されるが、この過程におけるシグナル伝達分子につき、様々な研究グループが ras-ERK または Akt/PKB 経路との関連を論じている⁴⁸⁻⁵³⁾。例えば、Ellenrieder らは ki-Ras 変異を有し、ras-ERK pathway が恒常的に活性化された脾臓癌細胞において、TGF- β 1 による刺激が EMT を誘導することを報告している⁵¹⁾。さらに、Grille らは口腔扁平上皮癌細胞株において Akt/PKB を恒常的に活性化させることで、上皮系マーカーである desmoplakin, E-cadherin, β -catenin などの発現低下や間葉系マーカーである vimentin の発現上昇などが誘導できることを観察している⁵²⁾。さらに、Chan らは EMT の誘導シグナルである ras あるいは src が、PI3K-Akt/PKB 経路を活性化させることを報告している⁵³⁾。本研究においても SDF-1 処理によって生じた B88 細胞における vimentin 蛋白の発現上昇と突起形成は、PI3K 阻害剤である Wortmannin 処理により著明に抑制された。すでに我々の研究室では、SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔扁平上皮癌のリンパ節転移に src family kinases (以下 SFKs と略) が関連しているということを明らかにしており¹⁰⁾、SDF-1/CXCR4 システムによる EMT の誘導には、SFKs を介する PI3K-Akt 伝達経路の活性化が重要である可能性が示唆された。

口腔扁平上皮癌は、高い局所浸潤能と高頻度に生じる頸部所属リンパ節転移を特徴とする。すでに我々の研究室では、口腔扁平上皮癌細胞が matrix metalloproteinases (以下 MMPs と略) や urokinase-type plasminogen activator (以下 uPA と略) などの蛋白分解酵素を多量に産生しており、これらの産生が口腔扁平上皮癌の高い浸潤能の一因であることを報告している⁴¹⁾。一方で、これら MMPs や uPAs の産生は EMT の一因となることも示唆されているが⁵⁴⁻⁵⁶⁾、我々が検証したところ、SDF-1 刺激による MMP-2, MMP-7, uPA の発現変化は認められなかった (データは示していない)。Scotton らは、SDF-1 刺激によって増強された卵巣癌細胞の浸潤が、MMP 阻害剤である marimastat によって阻害されたが、MMPs や MMP 阻害分子である tissue inhibitor of MMP (以下 TIMPs と略) の発現は、SDF-1 刺激により変動しなかったと報告している⁵⁷⁾。この点に関し、彼らは使用した卵巣癌細胞は他の様々な蛋白分解酵素を産生しており、これらを利用して浸潤能を獲得しているが、SDF-1/CXCR4 システムはこれらの蛋白分解酵素とは無関係に、ただ単に細胞運動を制御しているのではないかと推測している。本研究で使用した B88 細胞は数種類の MMP を発現しており¹²⁾、コラーゲンゲルに対する浸潤傾向を示したが、SDF-1 無刺激では EMT 様変化を示さなかった。従って、MMPs や uPA などは口腔扁平上皮癌細胞の浸潤に重要であるものの、SDF-1 によって誘導される EMT には関与していない可能性が示唆された。

本研究において、口腔扁平上皮癌同一患者の原発巣、

リンパ節転移巣における SDF-1 と CXCR4 の発現を検索したところ、SDF-1 陽性症例数は、転移リンパ節巣において有意に増加していた。他の CXC-ケモカインとは異なり、SDF-1 の発現は、間葉系細胞を含め様々な細胞に幅広く認められることが知られている^{58, 59)}。また、sdf-1 プロモーター配列には、ハウスキープ遺伝子のプロモーター配列内に存在することが知られている、数多くの CpG islands が含まれている⁵⁸⁾。さらに、他の CXC-ケモカインのプロモーター領域に存在している転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や activator protein (AP)-1 の結合モチーフは、19 kb の *sdf-1* ゲノムにおいて確認されていない⁵⁸⁾。それゆえ、一般的に SDF-1 は恒常的に発現していると考えられてきた。しかしながら、最近の報告において、SDF-1 の発現は hypoxia-inducible factor (以下 HIF と略)-1 により制御されている可能性が報告された^{60, 61)}。また、HIF-1 に関しては、低酸素状態における CXCR4 のアップレギュレーションや、正常酸素状態下における von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (以下 pVHL と略) による HIF-1 の分解を介した CXCR4 のダウンレギュレーションが報告されている⁶²⁾。以上の報告を総合すると、口腔扁平上皮癌細胞の転移リンパ節における SDF-1 の発現獲得には、HIF-1 を介した上述のメカニズムが存在する可能性が考えられる。実際、原発巣を離脱した癌細胞は、一般に血液供給の低下による低酸素状態に曝されることより、HIF-1 などの環境因子の影響を受け、SDF-1 のみならず、CXCR4 の発現上昇も獲得し、SDF-1/CXCR4 autocrine loop を獲得している可能性が考えられた。

口腔扁平上皮癌は、高頻度に所属リンパ節転移を認めることが特徴であるが、遠隔転移は稀である。すでに我々の研究室では、血中に存在する口腔扁平上皮癌細胞を *cytokeratin 20* mRNA を指標に検出したところ、ほとんどの担癌患者において癌細胞が検出されたことから、遠隔転移の有無に関わらず癌細胞は比較的早期に体循環に流入することを明らかにしている⁶³⁾。さらに、臨床的に口腔扁平上皮癌において遠隔転移を生じた症例では、ほぼ全例にリンパ節転移が認められることから、口腔扁平上皮癌の遠隔転移は、転移リンパ節からの癌細胞の流入が主で起こると考えられる。すなわち、口腔扁平上皮癌が遠隔転移能を獲得するためには、血管内侵入能や血管新生能などよりも、転移リンパ節における血管外遊出能や異所性増殖能の獲得が、重要であることを示唆している。本研究において、SDF-1/CXCR4 autocrine loop は、B88 細胞の細胞遊走能や足場非依存性増殖能を亢進させていた。また、Iikura らにより SDF-1/CXCR4 の活性化が、好塩基球の強い血管外遊出の誘因となることも報告されている⁶⁴⁾。本研究の結果を含めたこれらの現象は、SDF-1/CXCR4 autocrine loop が口腔扁平上皮癌細胞に、遠隔転移の成立に不可欠である血管外遊出能や異所性増殖能を獲得させる可能性を強く示唆している。

2001年、Müller らによって、乳癌の臓器特異的遠隔転移に SDF-1/CXCR4 システムが関与していることが報告された¹⁶⁾。以後、多種多様な癌における本システムとリンパ節転移・遠隔転移との関連が報告されたが¹⁷⁻²²⁾、現在のところ SDF-1/CXCR4 システムは臓器特異的遠隔転移を制御する paracrine loop として考えられている²³⁾。しかしながら、本研究の実験結果では、SDF-1/CXCR4 autocrine loop を有する B88-SDF-1 細胞は遠隔転移能を獲得していたが、autocrine loop を有しない mock 細胞では、血管内移植によっても遠隔転移をほとんど生じなかった。これらの結果は、口腔扁平上皮癌の遠隔転移には SDF-1/CXCR4 paracrine loop の活性化のみでは不十分であることを示している。近年、乳癌の30%で遺伝子増幅されている human epithelial growth factor (以下 HER と略) 2-neu⁶⁵⁾ を SDF-1 が活性化することが明らかにされた⁶⁶⁾。さらに Li らは、HER2-neu 依存性の in vitro における浸潤や in vivo における肺転移に、HER2-neu による CXCR4 の発現増強が必要であることを明らかにしている⁶⁷⁾。以上の報告を総合すると、乳癌細胞は、遠隔転移成立のために、SDF-1/CXCR4 paracrine loop と SDF-1/HER2 経路の両者を使用していると考えられる。しかしながら、口腔扁平上皮癌における HER2 の過剰発現は3.6%と大変低く⁶⁸⁾、0%とさえも報告されている⁶⁹⁾。従って、CXCR4 の発現頻度が乳癌と同程度であるにも関わらず、口腔扁平上皮癌に遠隔転移が少ない理由は、使用できる経路が SDF-1/CXCR4 paracrine loop のみであることが一因かもしれない。そのため、本研究で明らかにした SDF-1/CXCR4 autocrine loop は、口腔扁平上皮癌にとって遠隔転移能を獲得するための、重要な遺伝子発現変化であることが推察される。実際、SDF-1/CXCR4 システムの autocrine loop が、前立腺癌細胞⁷⁰⁾、甲状腺癌細胞²²⁾、骨肉腫細胞⁷¹⁾、カボジ肉腫細胞⁷²⁾ など高転移能を有する腫瘍で確認されており、SDF-1/CXCR4 autocrine loop の獲得が、腫瘍細胞の浸潤、転移能の獲得に重要な一歩であることが示唆される。それゆえ、SDF-1 とリンパ節転移の指標でもある CXCR4 を共発現することは、口腔扁平上皮癌における潜在的遠隔転移能の予知マーカーとなりうる可能性があると考えられた。

AMD3100 は抗 HIV 活性を有するバイサイクリン構造体として同定されたが⁷³⁾、現在では HIV の共受容体である CXCR4 に対し選択的に作用していることが明らかにされている⁷⁴⁻⁷⁶⁾。その後、CXCR4 を発現している癌細胞の浸潤転移を in vitro, in vivo において抑制することも実証されており^{57, 77, 78)}、AMD3100 は SDF-1/CXCR4 の相互作用を生物学的に検証するために有効な薬剤であると考えられている。本研究では、AMD3100 は B88-SDF-1 細胞の肺転移を有意に阻害し、体重減少を軽減させ、癌悪液質病態を軽減させると共に担癌マウスの生存率を向上させた。癌悪液質病態には、従来 interleukin (以下 IL と略)-1, IL-6, IL-8, IL-11, Tumor necrosis factor-

α (以下 TNF- α と略) 等の各種サイトカインの産生が関連していると考えられている^{79, 80)}。SDF-1/CXCR4 システムは IL-6 や IL-8⁸¹⁾, TNF- α ⁵⁷⁾ の産生を増強させることが報告されており, AMD3100 投与マウスにおいて, 腫瘍由来のサイトカイン産生が抑制され, 癌悪液質を抑制したとも考えられる。これらの結果は, AMD3100 が口腔扁平上皮癌の転移抑制剤として有用である可能性を示唆するとともに, 癌患者の癌悪液質を軽減させる可能性も示唆している。また, AMD3100 は HIV 治療以外にも CD34 陽性造血性幹細胞を動員する際の治療薬として臨床試験が行われていることから^{44, 45)}, 一般的な癌化学療法時に生じる血球減少症においても効果を発揮することが考えられ, 将来, AMD3100 は転移抑制作用を有する造血性幹細胞の遊走促進薬として有用である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究課題を与えられ御指導を賜った口腔腫瘍制御学分野 佐藤光信名誉教授, 吉田秀夫助教授に深甚なる謝意を表しますとともに, 御校閲, 御助言を戴いた口腔顎顔面外科学分野 長山 勝教授, 口腔分子病態学分野 林 良夫教授, 分子医化学分野 野間隆文教授に深謝いたします。

また, 本研究の実施に際し終始御指導を戴いた口腔腫瘍制御学分野 内田大亮博士ならびに, 研究の円滑な進展のために特別の御配慮を戴いた口腔腫瘍制御学分野の教室の方々に深謝致します。

参考文献

- 1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94, 153-156 (2001)
- 2) 厚生労働省がん研究助成金「地域がん登録精度向上と活用に関する研究」平成16年度報告書
- 3) Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D and Myers JN: Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer* 98, 508-515 (2003)
- 4) Hemmer J and Kreidler J: Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. Comparison with clinical staging and histologic grading. *Cancer* 66, 317-320 (1990)
- 5) Ono I, Ebihara S, Saito H and Yoshizumi T: Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 12, 85-89 (1987)
- 6) Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS and Shedd DP: Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg* 134, 450-454 (1977)
- 7) Rossi D and Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242 (2000)
- 8) Zlotnik A and Yoshie O: Chemokine a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127 (2000)
- 9) Yoshie O, Imai T and Nomiyama H: Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78, 57-110 (2001)
- 10) Uchida D, Begum NM, Ammar A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H and Sato M: Possible role of stromal cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 290, 289-302 (2003)
- 11) Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H and Sato M: Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 84, 1538-1546 (2004)
- 12) Ammar A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H and Sato M: The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 25, 65-71 (2004)
- 13) Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454 (2002)
- 14) Guarino M: Epithelial to mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanism to pathological patterns. *Histol Histopathol* 10, 171-184 (1995)
- 15) Gillis C and Thompson EW: The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma. *Breast J* 2, 83-96 (1996)
- 16) Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik A: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56 (2001)
- 17) Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G and Balkwill FR: Epithelial cancer cell migration, a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965 (2001)
- 18) Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS and McCauley LK: Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-1837 (2002)
- 19) Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J and Lauber J: CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer* 86, 1250-1256 (2002)
- 20) Zhou Y, Larsen PH, Hao C and Yong VW: CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates

- their survival. *J Biol Chem* 277, 49481-49487 (2002)
- 21) Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE and Salgia R: Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62, 6304-6311 (2002)
 - 22) Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY and Shong M: CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 408-416 (2003)
 - 23) Zlotnik A: Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 14, 181-185 (2004)
 - 24) Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, Mutaguchi K, Yasumoto H, Dahiya R, Usui T and Kamiya K: Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 656-663 (2004)
 - 25) Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP and Strieter RM: The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1676-1686 (2003)
 - 26) Milliken D, Scotton C, Raju S, Balkwill F and Wilson J: Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clin Cancer Res* 8, 1108-1114 (2002)
 - 27) Katayama A, Ogino T, Bandoh N, Nonaka S and Harabuchi Y: Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN- γ in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11, 2937-2946 (2005)
 - 28) Jeon YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW and Chung DH: Clinicopathologic features and prognostic implications growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 54, 387-398 (2006)
 - 29) Takeshima N, Hirai Y, Umayahara K, Fujiwara K, Takizawa K and Hasumi K: Lymph node metastasis in ovarian cancer: difference between serous and non-serous primary tumors. *Gynecol Oncol* 99, 427-431 (2005)
 - 30) Chen SC, Chen MF, Hwang TL, Chao TC, Lo YF, Hsueh, Chang JT, Leung WM: Prediction of supraclavicular lymph node metastasis in breast carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52, 614-619 (2001)
 - 31) Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV and Magrin J: Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 41, 534-541 (2005)
 - 32) Brouwer J, de Bree R, Hoekstra OS, Golding RP, Langendijk JA, Castelijns JA and Leemans CR: Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is chest computed tomography sufficient? *Laryngoscope* 115, 1813-1817 (2005)
 - 33) Alvi A and Johnson JT: Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* 19, 500-505 (1997)
 - 34) Nicolson GL: Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2, 143-154 (1991)
 - 35) Nicolson GL: Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12, 325-343 (1993)
 - 36) Otsuka T, Takayama H, Sharp R, Celli G, LaRochelle WJ, Bottaro DP, Ellmore N, Vieira W, Owens JW, Anver M and Merilino G: c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res* 58, 5157-5167 (1998)
 - 37) Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H and Grunert S: Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 116, 1561-1570 (2006)
 - 38) Oft M, Heider KH and Beug H: TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 8, 1243-1252 (1998)
 - 39) Tsutsumi S, Yanagawa T, Shimura T, Kuwano H and Raz A: Autocrine motility factor signaling enhances pancreatic cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 10, 7775-7784 (2004)
 - 40) Sugiyama K, Yonemura Y and Miyazaki I: Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer* 63, 1557-1561 (1989)
 - 41) Tanaka J, Miwa Y, Miyoshi K, Ueno A and Inoue H: Construction of Epstein-Barr virus-based expression vector containing mini-oriP. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 938-943 (1999)
 - 42) Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Hino S, Harada K, Yoshida H and Sato M: Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* 70, 120-127 (1997)
 - 43) De Clercq E: The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2, 581-587 (2003)
 - 44) Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, Dehner C, Badel K, Carandra G, Christensen J, Wood B, Price TH and Dale

- DC: Augmented mobilization and collection of CD34⁺ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 45, 295-300 (2005)
- 45) De Clercq E: Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* 5, 805-824 (2005)
- 46) Nawshad A and Hay ED: TGF β_3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. *J Cell Biol* 95, 333-339 (1982)
- 47) Hay ED and Zuk A: Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26, 678-690 (1995)
- 48) Zhang KX, Ward KR and Schrader JW: Multiple aspects of the phenotype of mammary epithelial cells transformed by expression of activated M-Ras depend on an autocrine mechanism mediated by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Mol Cancer Res* 2, 242-255 (2004)
- 49) Boyer B, Valles AM and Edme N: Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 60, 1091-1099 (2000)
- 50) Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME and Moses HL: Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6, 603-610 (2004)
- 51) Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G and Gress TM: Transforming growth factor β 1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61, 4222-4228 (2001)
- 52) Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN and Larue L: The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 63, 2172-2178 (2003)
- 53) Chan TO, Rodeck U, Chan AM, Kimmelman AC, Rittenhouse SE, Panayotou G and Tsichlis PN: Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* 1, 181-191 (2002)
- 54) Jorda M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A and Fabra A: Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 118, 3371-3385 (2005)
- 55) Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H and Nagayama M: Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 22, 891-898 (2003)
- 56) Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brunner N and Thompson EW: Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 15, 519-526 (1997)
- 57) Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G and Balkwill FR: Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938 (2002)
- 58) Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T and Honjo T: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500 (1995)
- 59) Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T and Honjo T: Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603 (1993)
- 60) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D and El-Gabalawy H: Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46, 2587-2597 (2002)
- 61) Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP and Gurtner GC: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864 (2004)
- 62) Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ and Krek W: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311 (2003)
- 63) Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, Hino S, Sato M and Oyasu R: Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients. *Br J Cancer* 80, 448-452 (1999)
- 64) Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K and Hirai K: Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol* 173, 5189-5195 (2004)
- 65) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182 (1987)
- 66) Cabioglu N, Summy J, Miller C, Parikh NU, Sahin AA, Tuzlali S, Pumiqlia K, Gallick GE and Price JE: CXCL-

- 12/stromal cell-derived factor-1 α transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res* 65, 6493-6497 (2005)
- 67) Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, Yu D and Hung MC: Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6, 459-469 (2004)
 - 68) Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devans F, Benner A, Bosch FX, Lichter P and Hofele C: Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63, 1179-1182 (2003)
 - 69) Riviere A, Becker J and Loning T: Comparative investigation of c-erbB2/neu expression in head and neck tumors and mammary cancer. *Cancer* 67, 2142-2149 (1991)
 - 70) Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ and Taichman RS: Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89, 462-473 (2003)
 - 71) Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, Fonsato V, Mitola S, Grignani G, Surrenti N, Sangiolo D, Bussolino F, Piacibello W and Aglietta M: Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin Cancer Res* 11, 490-497 (2005)
 - 72) Wang JF, Liu ZY, Anand AR, Zhang X, Brown LF, Dezube BJ, Gill P and Ganju RK: Alpha-chemokine-mediated signal transduction in human Kaposi's sarcoma spindle cells. *Biochim Biophys Acta* 1691, 129-139 (2004)
 - 73) De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Baba M, Schols D, Nakashima H, Balzarini J, Debyser Z, Mutter BA, Schwartz D, Thornton D, Bridger G, Fricker S, Henson G, Abrams M and Picker D: Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5286-5290 (1992)
 - 74) Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G and De Clercq E: Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* 186, 1383-1388 (1997)
 - 75) Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E and Moore JP: AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4, 72-77 (1998)
 - 76) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877 (1996)
 - 77) Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD and Segal RA: A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13513-13518 (2003)
 - 78) Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnicka-Worms D and Luker GD: CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64, 8604-8612 (2004)
 - 79) Kurzrock R: The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* 92, 1684-1688 (2001)
 - 80) Pfizenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D Jr and Corey E: Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer* 97, 1211-1216 (2003)
 - 81) Nanki T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y and Miyasaka N: Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167, 5381-5385 (2001)